

## Экспериментальная оценка методов определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта

Ю.В. Олефир, А.И. Лутцева, О.В. Гунар, Н.Г. Сахно, В.Э. Григорьева

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

**Резюме:** Приведены результаты сравнительного анализа способов определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта. Описаны особенности методов серийных разведений и выявлены преимущества использования агаризованной питательной среды для последующего учета результатов испытания указанными методами. Подтверждена возможность равнозначного применения чашечного и пробирочного методов оценки антимикробной активности препаратов хлорофиллипта в виде спиртовых и масляных извлечений. Отмечена необходимость строгого соблюдения стандартности выполнения всех лабораторных процедур и предварительного подтверждения качества питательных сред. В ходе экспериментального изучения антимикробной активности хлорофиллипта с применением 4-х видов микроорганизмов была подтверждена целесообразность использования в качестве тест-микроорганизма штамм *S. aureus*. Экспериментально показано, что выбор метода не влияет на результат испытания по показателю «Антимикробная активность» и обусловлен лишь особенностями образца.

**Ключевые слова:** антимикробная активность; препараты хлорофиллипта; методы серийных разведений.

**Библиографическое описание:** Олефир ЮВ, Лутцева АИ, Гунар ОВ, Сахно НГ, Григорьева ВЭ. Экспериментальная оценка методов определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (4): 47–50.

### EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE METHODS FOR DETERMINING THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHLOROPHYLLIPT

Yu.V. Olefir, A.I. Lutseva, O.V. Gunar, N.G. Sakhno, V.E. Grigorieva

Federal State Budgetary Institution  
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

**Abstract:** The present article describes the results of a comparative analysis of methods for determining the antimicrobial activity of chlorophyllipt. It mentions the aspects of serial dilution method and shows the advantages of using agar culture medium for subsequent recording of test results performed by the mentioned methods. The possibility of an equivalent use of cup and test-tube methods for the assessment of antimicrobial activity of chlorophyllipt in the form of alcohol and oil extracts has been confirmed. The necessity of exact compliance with the standards of laboratory procedures and initial verification of culture media quality was noted. During the experimental study of the antimicrobial activity of chlorophyllipt, using 4 types of microorganisms, the feasibility of using *S. aureus* strain as a test microorganism has been confirmed. The experiment has shown that the choice of the method does not affect the result of the test in terms of «antimicrobial activity» and it only depends on the characteristics of the sample.

**Key words:** antimicrobial activity; chlorophyllipt; serial dilution methods.

**For citation:** Olefir YuV, Lutseva AI, Gunar OV, Sakhno NG, Grigorieva VE. Experimental evaluation of the methods for determining the antimicrobial activity of chlorophyllipt. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2015; (4): 47–50.

Среди противомикробных средств особое место занимают препараты из лекарственного растительного сырья. Фитопрепараты, предназначенные для лечения заболеваний различной этиологии, как правило, включают в себя растительные экстракты, содержащие комплекс биологически активных веществ, которые в большинстве случаев нетоксичны, не оказывают раздражающего действия, не вызывают аллергических реакций. Особый интерес представляют растительные экстракты, проявляющие активность в отношении штаммов микроорганизмов, устойчивых к некоторым антибиотикам и синтетическим лекарственным препаратам [1, 2]. Одним из таких соединений является хлорофиллипт (Chlorophylliptum) — биологически активная субстанция, получаемая из листьев эвкалипта.

Хлорофиллипт обладает антибактериальным действием в отношении стафилококков, устойчивых к антибиотикам, а также комплексно воздействует на патогенетический механизм воспаления. Антимикробные свойства проявляют вещества, входящие в экстракт из

высушенных листьев эвкалипта, в частности, фенолальдегиды, или эуглобали, относящиеся к терпеновым производным флороглюцина [1, 3].

Область применения препаратов из эвкалипта довольно широка благодаря оказываемому действию (антибактериальному, противовоспалительному, спазмолитическому, кровоостанавливающему, ранозаживляющему и др.). Они находят применение в различных областях медицины: стоматологии, хирургии, гинекологии, оториноларингологии и дерматологии.

Данное лекарственное средство (ЛС) представлено в различных формах выпуска, среди которых выделяют спиртовой раствор, масляный раствор, таблетки для рассасывания, гель и спрей.

При фармацевтическом анализе препаратов хлорофиллипта определяют их антимикробную активность [4]. Для этого используют методы серийных разведений, основанные на прямом определении минимальной концентрации (или максимального разведения) препарата, подавляющего видимый рост исследуемого микроорга-

низма. В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в жидкой и плотной питательных средах [5].

При изучении нормативной документации на различные лекарственные формы препарата хлорофиллипт было выявлено отсутствие стандартности методик определения их антимикробной активности. Так, для препаратов «Хлорофиллипт, раствор для приема внутрь и местного применения, спиртовой 1%» и «Хлорофиллипт, сырье растительное экстракт – густой» рекомендовано проводить испытание методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде, при анализе препарата «Хлорофиллипт, раствор для местного применения масляный 2%» – методом двукратных разведений в агаризованной питательной среде.

Целью данной работы явился сравнительный анализ способов определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта и изучение методических особенностей данного вида испытания.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) изучить антимикробную активность препаратов хлорофиллипта в отношении различных тест-микроорганизмов;
- 2) провести экспериментальное сравнение существующих методик определения качества препаратов по данному показателю.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие материалы.

1. Образцы лекарственных препаратов «Хлорофиллипт, раствор для приема внутрь и местного применения спиртовой 1%», «Хлорофиллипт, раствор для местного применения масляный 2%» отечественного производства.

2. Тест-штаммы в виде типовых стандартных культур микроорганизмов: *Bacillus cereus* ATCC 10702; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Escherichia coli* ATCC 8739; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3. Питательные среды производства фирмы «Biomérieux», Франция: триптиказо-соевый агар (TSA); триптиказо-соевый бульон (TSB).

Антимикробную активность препаратов Хлорофиллипта определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой и плотной питательных средах.

### 1) Метод двукратных серийных разведений в бульоне

Взвесь тест-штамма микроорганизма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, приготовленную с использованием 24-часовой культуры, выращенной на скошенной агаризованной среде, стандартизовали с помощью оптического стандартного образца мутности ВОЗ и делали ряд последовательных разведений до получения концентрации клеток  $2,5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл.

1 мл исследуемого препарата дважды последовательно разводили в 9 мл воды до получения концентрации 100 мкг/мл (основной раствор).

Для испытания использовали два ряда пробирок по 4 в каждом, содержащих по 2 мл TSB. В первые пробирки вносили по 2 мл основного раствора и делали последовательные двукратные разведения исследуемого препарата до получения концентрации 6,25 мкг/мл. Из двух последних пробирок каждого ряда удаляли по 2 мл смеси препарата со средой. Во все пробирки вносили по 0,2 мл при-

готовленной бактериальной взвеси. Посевы инкубировали при температуре  $(33,5 \pm 1,5)^\circ\text{C}$  в течение 18–24 часов.

Одновременно проводили контроль стерильности используемой питательной среды и роста микроорганизма.

Антимикробную активность препарата оценивали визуально, сравнивая прозрачность среды каждой пробирки с двумя контрольными, определяя наименьшую концентрацию ЛС, обеспечивающую задержку роста тест-штамма.

### 2) Метод двукратных серийных разведений в агаре

Для испытания использовали 24-часовую бульонную культуру тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, которую разводили в соотношении 1:1000 стерильным изотоническим раствором натрия хлорида изотонического 0,9%.

В стерильную колбу помещали 1,5 мл исследуемого препарата и прибавляли 13,5 мл расплавленной при температуре  $(85 \pm 5)^\circ\text{C}$  среды TSA (таким образом получали разведение 1:10). От полученного разведения отбирали аликвоту 10 мл, переносили ее в стерильную колбу, куда затем прибавляли 90 мл расплавленной питательной среды TSA и перемешивали, получая разведение 1:100. После этого делали ряд последовательных двукратных разведений препарата в агаризованной среде 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, что соответствовало концентрациям хлорофиллипта 100; 50; 25; 12,5; 6,25 мкг/мл. По 15 мл из каждого разведения помещали в две стерильные чашки Петри диаметром 90 мм.

В контрольные чашки помещали 0,3 мл масла и 15 мл питательной среды. В каждую чашку Петри на поверхность застывшей среды методом репликаций наносили подготовленную взвесь тест-штамма. Посевы инкубировали при температуре  $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Отмечали последнее разведение препарата, в котором отсутствовал рост микроорганизма по сравнению с контролем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения антимикробного действия препаратов Хлорофиллипта, был проведен сравнительный эксперимент с использованием нескольких фармакопейных тест-штаммов бактерий (табл. 1).

Как видно, препараты хлорофиллипта в разведении 1:200 не обладали антимикробной активностью в отношении тест-штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*, в то время как рост микроорганизмов *S. aureus* и *B. cereus* в этих условиях отсутствовал. Полученные результаты подтверждают данные литературы о том, что хлорофиллипт является высокоактивным в отношении грамположительной микрофлоры, в особенности – против стафилококков, в том числе антибиотикоустойчивых [6].

Вероятно, причина высокой чувствительности указанных микроорганизмов кроется в строении клеток и механизмах резистентности, присущих определенным видам. Клеточная стенка бактерий рода *Staphylococcus* состоит преимущественно из пептидогликанов и тейхоевой кислоты. Ни то, ни другое не является эффективным барьером, защищающим клетки от проникновения антисептиков и дезинфектантов, так как высокомолекулярные вещества могут легко проходить через клеточную стенку *Staphylococcus spp.* и вегетативных клеток бактерий рода *Bacillus*.

Таблица 1

### АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ХЛОРОФИЛЛИПТА В ОТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Разведение	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
Хлорофиллипт, раствор для местного применения масляный 2%				
1:200	—	+	+	—
1:400	+	+	+	+
1:800	+	+	+	+
1:1600	+	+	+	+
Хлорофиллипт, раствор для приема внутрь и местного применения спиртовой 1%				
1:200	—	+	+	—
1:400	+	+	+	—
1:800	+	+	+	+
1:1600	+	+	+	+

Условные обозначения: «—» — нет роста, «+» — видимый рост

Таблица 2

### АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ХЛОРОФИЛЛИПТА В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-ШТАММА *S. AUREUS*

Разведение препарата	«Хлорофиллипт раствор для приема внутрь и местного применения спиртовой 1%»		«Хлорофиллипт раствор для местного применения масляный 2%»	
	Чашечный метод	Пробирочный метод	Чашечный метод	Пробирочный метод
1:200	—	—	—	—
1:400	—	—	—	—
1:800	—	—	—	—
1:1600	—	—		
1:3200	+	+		

Условные обозначения: «—» — нет роста, «+» — видимый рост. Цветом обозначено максимальное разведение, в котором должен отсутствовать рост тест-штамма *S. aureus* в соответствии с требованием НД

Грамотрицательные бактерии (например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus spp.*), как правило, более устойчивы, чем грамположительные бактерии к действию различных антисептиков. Это, возможно, обеспечивается цитоплазматической мембраной, которая состоит из липопротеинов и, как можно считать, препятствует пассивной диффузии гидрофильных молекул [7].

Учитывая все вышесказанное, а также спорообразующие свойства и возможность формирования резистентности бактерий рода *Bacillus* к действию ряда антисептических ЛС, в том числе спиртовых растворов, в качестве тест-штамма для определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта наиболее целесообразно использовать именно вид *S. aureus*.

С целью сравнительного изучения чашечного и пробирочного методов, используемых в настоящее время для определения антимикробной активности, был проведен анализ качества препаратов «Хлорофиллипт, раствор для приема внутрь и местного применения спиртовой 1%» и «Хлорофиллипт, раствор для местного применения масляный 2%» (табл. 2).

Изученные препараты соответствовали требованиям нормативной документации по определяемому показателю, причем результаты оценки двумя методами не различались между собой. Это говорит о возможности получения достоверных результатов об их антимикробной активности независимо от выбранной методики испытания.

Несмотря на то, что методы серийных разведений являются достаточно точными и информативными, их вы-

полнение в практических условиях сопряжено с некоторыми методическими трудностями. Прежде всего, речь идет о необходимости строгого соблюдения стандартности выполнения всех лабораторных процедур (поддержания температуры агаризованной питательной среды, условий инкубации и т. п.), предварительного подтверждения качества питательных сред, трудоемкости процедуры приготовления рабочих разведений образца.

Следует отметить, что учет результатов удобнее проводить после посева чашечным методом, так как при использовании пробирочного метода в ряде случаев невозможно отличить взаимодействие препарата со средой (помутнение, опалесценцию) от роста тест-штамма микроорганизма.

Кроме того, метод серийных разведений в агаризованной среде позволяет одновременно определить минимальные ингибирующие концентрации препаратов хлорофиллипта в отношении нескольких тест-штаммов, что может быть целесообразно при скрининговой оценке антимикробных свойств вновь разрабатываемых ЛС растительного происхождения.

### ВЫВОДЫ

1. В ходе экспериментального изучения антимикробной активности различных препаратов хлорофиллипта была подтверждена целесообразность использования в качестве тест-штамма *S. aureus*.

2. Согласно полученным данным выбор метода не влияет на результат испытания по показателю «Антимикробная активность» и обусловлен лишь особенностями образца.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хаджиева ЗД, Теунова ЕА, Крахмалев ИС. Изучение антимикробной активности лекарственных препаратов с фитоэкстрактом. *Фундаментальные исследования* 2010; (11): 152–4.
2. Киселева ТЛ. Лекарственное растительное сырье и растительные лекарственные средства из него, используемые в лечении сердечно-сосудистых и сопутствующих заболеваний. В кн.: Киселева ТЛ, Карпеев АА, ред. Гомеопатия и фитотерапия в лечении сердечно-сосудистых болезней. Т. 2. М.: Мосгорпечать; 1997. С. 383.
3. Зилфикаров ИН. Новые подходы в разработке и стандартизации фитопрепаратов из эфирномасличного сырья: дисс. ... д-ра фарм. наук. Пятигорск; 2008.
4. Зилфикаров ИН, Гунар ОВ. Вопросы стандартизации препарата Хлорофиллипт раствор в масле 2%. *Фармация* 2007; (3): 7–9.
5. Денисова СВ, Гунар ОВ. Сравнение методов определения антимикробной активности препаратов хлорофиллипта в масле. В кн.: Материалы докладов XIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 16–20 апреля 2007 г. С. 16–17.
6. el-Nakeeb MA, Yousef RT. Antimicrobial Activity of Sodium Copper Chlorophyllin. *Pharmazie* 1974; 29(1): 48–50.
7. McDonell G. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 147–79.

## ОБ АВТОРАХ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

*Олефир Юрий Витальевич.* Генеральный директор, д-р мед. наук.

*Лутцева Анна Ивановна.* Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

*Гунар Ольга Викторовна.* Начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д-р фарм. наук.

*Сахно Надежда Геннадьевна.* Ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

*Григорьева Виктория Эдуардовна.* Эксперт 2-й категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

## АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Гунар Ольга Викторовна; Gunar@expmmed.ru

Статья поступила 14.10.2015 г.

## REFERENCES

1. Hadzhieva ZD, Teunova EA, Krahmalev IS. Study of antimicrobial activity of drugs with Phytoextract. *Fundamentalnye issledovaniya* 2010; (11): 152–4 (in Russian).
2. Kiseleva TL. Medicinal herbs and herbal remedies of it used in the treatment of cardiovascular and related diseases. In: Kiseleva TL, Karpeev AA, eds. *Homeopathy and herbal medicine in the treatment of cardiovascular diseases*. V. 2. Moscow: Mosgorpechat; 1997. P. 383 (in Russian).
3. Zilfikarov IN. New approaches in the development and standardization of phytopreparations of aromatic raw materials. *DrPharmSci* [dissertation]. Pyatigorsk; 2008 (in Russian).
4. Zilfikarov IN, Gunar OV. Standardization of Chlorophylliptum, oil solution 2%. *Farmatsiya* 2007; (3): 7–9 (in Russian).
5. Denisova SV, Gunar OV. Comparison of methods for determination of antimicrobial activity of preparations of Chlorophylliptum in oil. In: *Materials of the XIV Russian National Congress «Human and Medicine»*, Moscow, 16–20 April 2007. P. 16–17 (in Russian).
6. el-Nakeeb MA, Yousef RT. Antimicrobial Activity of Sodium Copper Chlorophyllin. *Pharmazie* 1974; 29(1): 48–50.
7. McDonell G. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 147–79.

## AUTHORS:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

*Olefir YuV.* Director General. Doctor of Medical Sciences.

*Lutseva AI.* Deputy head of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

*Gunar OV.* Head of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Doctor of Pharmaceutical Sciences.

*Sakhno NG.* Leading expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

*Grigorieva VE.* 2nd category expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines.

Принята к печати 27.10.2015 г.